

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/EP05/001863

International filing date: 23 February 2005 (23.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 10 2004 017 518.7

Filing date: 08 April 2004 (08.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 08 June 2005 (08.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

03.06.2005



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 10 2004 017 518.7

**Anmeldetag:** 08. April 2004

**Anmelder/Inhaber:** BASF Plant Science GmbH, 67065 Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von mehrfach  
ungesättigten Fettsäuren

**IPC:** C 12 N 15/82

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 17. Mai 2005  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

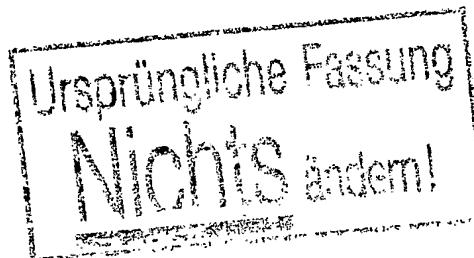
  
Letzang

PF 55540-UP

# ■ MAIWALD PATENTANWALTS GMBH ■



München · Hamburg · Düsseldorf  
New York



Patentanwälte:  
Dr. Walter Maiwald (München)  
Dr. Volker Hamm (Hamburg)  
Dr. Stefan Michałski (Düsseldorf)  
Dr. Regine Neuereind (München)  
Dipl.-Ing. Udo Preuss (München)  
Dipl.-Ing. Karolin Kopf, M.A. (München)  
Dr. Norbert Hansen (München)  
Dipl.-Ing. Lukas Kietzmann, LL.M. (Düsseldorf)  
Dr. Martin Huenges (München)  
Dr. Holger Gies (München)  
Dr. Verena Pfeiffer (München)  
Dr. Sigrid von Krosigk (Hamburg)

Rechtsanwälte:  
Steckhan M. Schneller (München)  
Markus Gottschalk, M.B.A. (München)

In Kooperation mit:  
Maiwald Inc.  
European IP Services, New York  
Dipl.-Ing. Karolin Kopf, M.A.  
U.S. Patent Agent

Aktenzeichen  
Neuanmeldung

Unser Zeichen  
B 7662 / RN

München,  
08. April 2004

BASF Plant Science GmbH

BPS – A 30, 67056 Ludwigshafen

Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Pflanzen, indem in die Pflanzen eingebrachte Nukleinsäuresequenzen gleichzeitig zur Expression gebracht werden, die für Polypeptide mit Δ-6-Desaturase-, Δ-6-Elongase- und Δ-5-Desaturaseaktivität kodieren. Bei den Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um die in SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 5

RN:LA:uh

dargestellten Sequenzen. Bevorzugt wird neben diesen Nukleinsäuresequenzen eine weitere Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodiert, in die Pflanze eingebracht und ebenfalls gleichzeitig exprimiert. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei um die in SEQ ID No. 7 dargestellte Nukleinsäuresequenz.

Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure und Eicosapentaensäure, in transgenen Pflanzen. Die Erfindung betrifft die Herstellung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure und Eicosapentaensäure, aufgrund der Expression der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Elongasen und Desaturasen.

Die Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die die Nukleinsäuresequenzen, die für die Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität kodieren, gemeinsam oder einzeln enthalten, sowie transgene Pflanzen, die die vorgenannten rekombinanten Nukleinsäuremoleküle enthalten.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, und deren Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese

beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend für die weiteren Elongationen aus den Phospholipiden wieder in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, Hrsg.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, Hrsg.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, *Biochim. Biophys.*

Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, die  $\omega$ -6- und die  $\omega$ -3-Fettsäuren, eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedliche Aktivitäten haben (Abb. 1).

Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

Als Ausgangsstoff für den  $\omega$ -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure ( $18:2^{\Delta 9,12}$ ), während der  $\omega$ -3-Weg über Linolensäure ( $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) abläuft. Linolensäure wird dabei durch die Aktivität einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Linolsäure gebildet (Tocher et al. 1998, Prog. Lipid Res. 37, 73-117 ; Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113).

Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität ( $\Delta$ -12- und  $\omega$ -3-Desaturase) zur Bildung dieser Ausgangsstoffe und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über eine Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA,  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ ), eine  $\omega$ -6-Fettsäure und die beiden  $\omega$ -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA,  $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ ) und Docosahexaensäure (DHA,  $22:6^{\Delta 4,7,10,13,17,19}$ ) synthetisiert.

Die Verlängerung von Fettsäuren durch Elongasen um 2 bzw. 4 C-Atome ist für die Produktion von  $C_{20}$ - bzw.  $C_{22}$ -PUFAs von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess verläuft über 4 Stufen. Den ersten Schritt stellt die Kondensation von Malonyl-CoA an das Fettsäure-

Acyl-CoA durch die Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS, im weiteren Text als Elongase bezeichnet) dar. Es folgt dann ein Reduktionsschritt (Ketoacyl-CoA-Reduktase, KCR), ein Dehydratationsschritt (Dehydratase) und ein abschließender Reduktionsschritt (Enoyl-CoA-Reduktase). Es wurde postuliert, dass die Aktivität der Elongase die Spezifität und Geschwindigkeit des gesamten Prozesses beeinflusst (Millar and Kunst, 1997 Plant Journal 12:121-131).

Für Fettsäuren und Triacylglyceride besteht eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, speziell mehrfach ungesättigten, Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser  $\omega$ -3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108).

Auch entzündliche, speziell chronisch entzündliche, Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch  $\omega$ -3-Fettsäuren positiv beeinflussen (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358; Cleland und James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307). Sie werden deshalb Lebensmitteln, speziell diätetischen Lebensmitteln, zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung.  $\omega$ -6-Fettsäuren wie Arachidonsäure üben bei diesen rheumatischen Erkrankungen eher einen negativen Effekt aus.

$\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo- $\gamma$ -linolensäure,

der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, und den Thromboxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten. Eicosanoide (sog. PG<sub>2</sub>-Serie), die aus ω-6-Fettsäuren gebildet werden, fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog. PG<sub>3</sub>-Serie) aus ω-3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben.

Mehrfach ungesättigte langkettige ω-3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) oder Docosahexaensäure (= DHA, C22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>) sind wichtige Komponenten der menschlichen Ernährung aufgrund ihrer verschiedenen Rollen in der Gesundheit, die Aspekte wie die Entwicklung des kindlichen Gehirns, die Funktionalität des Auges, die Synthese von Hormonen und anderer Signalstoffe, sowie die Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Beschwerden, Krebs und Diabetes umfassen (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA und Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999).

Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten ω-3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure (= DHA, C22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>) oder Eisosapentaensäure (= EPA, C20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) der Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder Schizochytrium oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie Cryptecodinium oder Phaeodactylum und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung der Triacylglyceride hergestellt. Sehr langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (ARA, C20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Dihomo-γ-linolensäure (DHGL, C20:3<sup>Δ8,11,14</sup>) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup>) werden

in Ölfruchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färbersaflor jedoch nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

Aufgrund der positiven Eigenschaften der mehrfach ungesättigten Fettsäuren hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese dieser Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase und in WO 94/11516 eine  $\Delta$ -12-Desaturase beansprucht. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144–20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200–203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141–12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777–792).

In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022, WO 00/21557 und WO 99/27111 beschrieben. Die Anwendung dieses Enzyms zur Produktion von Fettsäuren in transgenen Organismen wird in WO 98/46763, WO 98/46764 und WO 98/46765 beschrieben. Die Expression verschiedener Desaturasen und die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren wird auch in WO 99/64616 oder WO 98/46776 beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihrem Einfluss auf die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben

lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B.  $\gamma$ -Linolensäure und Stearidonsäure erreicht wurden.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, Elongase-Gene zu erhalten. Millar and Kunst, 1997 (Plant Journal 12:121-131) und Millar et al., 1999 (Plant Cell 11:825-838) beschreiben die Charakterisierung von pflanzlichen Elongasen zur Synthese von einfach ungesättigten langkettigen Fettsäuren (C22:1) bzw. zur Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren für die Wachsbildung in Pflanzen (C<sub>28</sub>-C<sub>32</sub>). Beschreibungen zur Synthese von Arachidonsäure und EPA finden sich beispielsweise in WO 01/59128, WO 00/12720, WO 02/077213 und WO 02/08401. Die Synthese von mehrfach ungesättigter C24-Fettsäuren ist beispielsweise in Tvrđik et al. 2000, J. Cell Biol. 149:707-718 oder WO 02/44320 beschrieben.

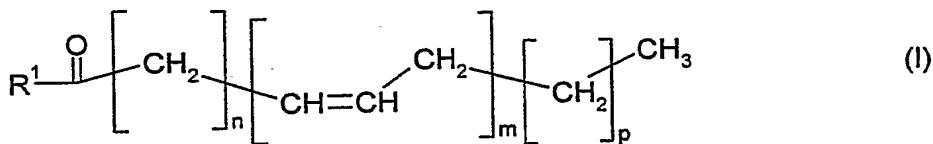
Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroalgen wie Phaeodactylum tricornutum, Porphyridium-Arten, Thraustochytrien-Arten, Schizochytrien-Arten oder Cryptecodinium-Arten, Ciliaten, wie Stylonychia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor und/oder Moose wie Physcomitrella, Ceratodon und Marchantia (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269-278). Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich zudem nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen, die noch dazu in der Regel als Fettsäuregemische anfallen. Deshalb werden, wann immer möglich, gentechnologische Verfahren bevorzugt.

Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3). ARA, EPA und DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Technique & Documentation – Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Es wäre jedoch vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu werden vorteilhafterweise über gentechnische Methoden Gene, die für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs kodieren, in Ölsaaten eingeführt und exprimiert. Dies sind Gene, die beispielsweise für Δ-6-Desaturasen, Δ-6-Elongasen, Δ-5-Desaturasen oder Δ-4-Desaturasen kodieren. Diese Gene können vorteilhaft aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs herstellen und in den Membranen oder Triacylglyceriden einbauen. So konnten bereits Δ-6-Desaturase-Gene aus dem Moos *Physcomitrella patens* und Δ-6-Elongase-Gene aus *P. patens* und dem Nematoden *C. elegans* isoliert werden.

Transgene Pflanzen, die für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese kodierende Gene enthalten und exprimieren und als Folge dessen LCPUFAs produzieren, wurden beispielsweise in DE-A-102 19 203 (Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen) beschrieben. Diese Pflanzen produzieren allerdings LCPUFAs in Mengen, die für eine Aufarbeitung der in den Pflanzen enthaltenen Öle noch weiter optimiert werden müssen. So beträgt der Gehalt von ARA in den in DE-A-102 19 203 beschriebenen Pflanzen lediglich 0,4 bis 2% und der Gehalt von EPA lediglich 0,5 bis 1%, jeweils bezogen auf den Gesamt-lipidgehalt der Pflanze.

Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren speziell in pflanzlichen Systemen.

Daher bestand die Aufgabe der Erfindung darin, ein Verfahren zur Herstellung großer Mengen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, speziell ARA und EPA, in einer transgenen Pflanze zu entwickeln. Diese Aufgabe wird durch das erfundungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



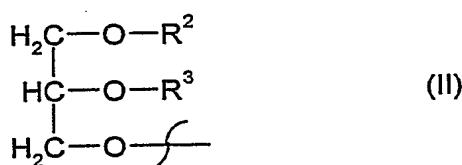
in transgenen Pflanzen gelöst, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität einer  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität kodiert, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 1 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind, und
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 3 dargestellten Sequenz,

- ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 4 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 3 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer Δ-5-Desaturase-Aktivität kodiert, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 5 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 6 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 5 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 5 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,

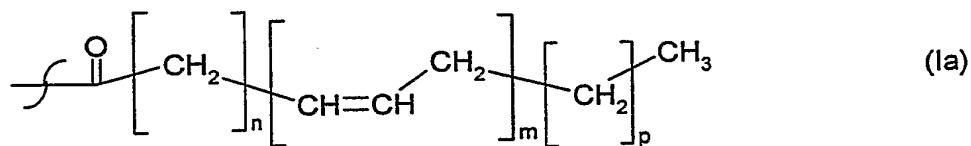
wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

R<sup>1</sup> = Hydroxyl, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-,  
Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-,  
Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-,  
Sphingobase-, oder ein Rest der allgemeinen Formel II



wobei  $\text{R}^2$  = Wasserstoff, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-  
Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-,  
Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-  
Alkylcarbonyl-

und  $\text{R}^3$  = Wasserstoff, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-, oder  $\text{R}^2$  oder  $\text{R}^3$   
unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ , darstellen.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren Nukleinsäuresequenzen sind beschrieben in WO 02/26946 ( $\Delta$ -5-Desaturase aus Thraustochytrium ssp., SEQ ID No. 5 und  $\Delta$ -6-Desaturase aus Phyti um irregulare, SEQ ID No. 1) sowie in WO 01/59128 ( $\Delta$ -6-Elongase aus Physcomitrella patens, SEQ ID No. 3), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird. Allerdings wurde in diesen Fällen die Bildung von ARA und EPA entweder nicht in transgenen Pflanzen, sondern lediglich in Mikroorganismen untersucht oder es konnte keine Steigerung der ARA- und EPA-Synthese in den transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden in diesen Anmeldungen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht mit Nukleinsäuren, die für andere Enzyme des Fettsäuresynthetewegs kodieren, kombiniert.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass die Co-Expression der Nukleinsäuren mit den in SEQ ID No. 1, 3 und 5 angegebenen Sequenzen in transgenen Pflanzen zu einer starken Erhöhung des ARA-Gehalts auf bis zu mehr als 8%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der Pflanze, führt (vgl. Tabelle 1 und Abbildung 2).

Zur weiteren Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft gegenüber Ölen und/oder Triglyceriden aus Wildtyp-Pflanzen erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem von ARA, kann es vorteilhaft sein, die Menge des Ausgangsstoffs für die Fettsäuresynthese zu steigern. Dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer  $\Delta$ -12-Desaturase kodiert, und deren Co-Expression in dem Organismus erreicht werden.

Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung *Brassica*, z.B. Raps, Rübsen oder Sareptasenf; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung *Elaeagnus* z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* oder der Familie Fabaceae wie der Gattung *Glycine* z.B. die Gattung und Art *Glycine max*, die einen hohen Ölsäuregehalt, aber nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681).

Daher wird in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz in die transgene Pflanze eingebracht, die für ein Polypeptid mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodiert.

Besonders bevorzugt ist diese Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 7 dargestellten Sequenz,

- b) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 8 dargestellte Aminosäuresequenz kodieren,
- c) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 7 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 7 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind.

Die Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID No. 7 stammt aus *Calendula officinalis* und ist beschrieben in WO 01/85968, deren Offenbarung hier ebenfalls durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung mit aufgenommen ist.

Vorteilhaft setzen die im erfingungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Ölsäure ( $C18:1^{\Delta 9}$ ) zu Linolsäure ( $C18:2^{\Delta 9,12}$ ) oder  $C18:2^{\Delta 6,9}$  zu  $C18:3^{\Delta 6,9,12}$  (Gamma-linolensäure = GLA), den Ausgangssubstanzen für die Synthese von ARA, um. Vorteilhaft setzen die verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft gebunden an CoA-Fettsäureester, um.

Die zusätzliche Expression der  $\Delta$ -12-Desaturase in den transgenen Pflanzen führt zu einer weiteren Steigerung des ARA-Gehalts auf bis zu mehr als 13%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der Pflanze (vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3).

Die Erfindung kann aber nicht nur mit den im Sequenzprotokoll angegebenen Nukleinsäuren erfolgreich umgesetzt werden, vielmehr können auch von diesen Sequenzen bis zu einem gewissen Grad abweichende Sequenzen, die für Proteine mit der im Wesentlichen gleichen enzymatischen Aktivität kodieren, eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um Nuklein-

säuren, die zu den im Sequenzprotokoll spezifizierten Sequenzen einen bestimmten Identitäts- oder Homologiegrad aufweisen.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-”Homologie”, wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-”Identität”). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als synonym anzusehen.

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für den Vergleich verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen, zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151–153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)], die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000.

Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet.

Der Fachmann erkennt, dass innerhalb einer Population DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen der Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 2, 4, 6 und/oder 8 führen, auftreten können. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-, und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase, und/oder  $\Delta$ -6-Elongase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die die enzymatische Aktivität nicht wesentlich verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfundungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase oder  $\Delta$ -5-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz und deren Derivate kodierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt von mindestens 20 %, besonders bevorzugt von mindestens 30 % oder mind. 40 % und am meisten bevorzugt von mindestens 50 % oder 60 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von Verbindungen, die zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureestern wie Diacylglyceriden und/oder Triacylglyceriden in einer Pflanze oder Pflanzenzelle benötigt werden oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier oder fünf Stellen gemeint sind.

Ebenfalls im Umfang der Erfindung enthalten sind Nukleinsäuremoleküle, die unter stringenten Bedingungen mit dem komplementären Strang der hier verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-, und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Nukleinsäuren hybridisieren. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen,

die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, bevorzugt mindestens etwa 70 % und besonders bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und z.B. in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., beschrieben.

Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringent Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass sich diese Hybridisierungsbedingungen je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Hybridisierungstemperatur liegt beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel, zum Beispiel 50 % Formamid, im obengenannten Puffer vorliegt, beträgt die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise 30°C bis 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise 45°C bis 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die für eine bestimmte Nukleinsäure erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie etwa Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University

Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz kann ein isoliertes Nukleinsäuremolekül erzeugt werden, das für eine  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen kodiert. Mutationen können in eine der Sequenzen durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einem oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäurereste hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase oder  $\Delta$ -6-Elongase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase, oder  $\Delta$ -6-Elongase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können durch rekombinante Expression nach der hier beschriebenen  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität durchmustert werden, um

Mutanten zu identifizieren, die die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität beibehalten haben.

Die oben genannten Reste von R<sup>1</sup> sind immer in Form ihrer Thioester an die Verbindungen der allgemeinen Formel I gebunden.

Als Alkylcarbonylreste, die als R<sup>2</sup> und/oder R<sup>3</sup> in der Formel I und/oder II vorliegen können, seien substituierte oder unsubstituierte, gesättigte oder ungesättigte C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten.

Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt.

Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten.

Am meisten bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten.

Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt vier oder fünf Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.

Die oben genannten Reste von R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> können mit Hydroxyl- und/oder Epoxygruppen substituiert sein und/oder können Dreifachbindungen enthalten.

Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei, bevorzugt drei, vier oder fünf Doppelbindungen. Besonders bevorzugt enthalten die Fettsäuren vier oder fünf Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren weisen bevorzugt eine Länge von 20 C-Atomen auf.

Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, dass im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 %, bevorzugt mit weniger als 3 %, besonders bevorzugt mit weniger als 2 %, am meisten bevorzugt mit weniger als 1; 0,5; 0,25 oder 0,125 % der Aktivität umgesetzt werden. Die hergestellten Fettsäuren können das einzige Produkt des Verfahrens darstellen oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride vorliegen. Die in den Triacylglyceriden gebundenen verschiedenen Fettsäuren lassen sich dabei von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettigen Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen ableiten, bevorzugt sind sie langkettige

Fettsäuren, besonders bevorzugt sind sie langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 18 und/oder 20 C-Atomen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhaft von vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt. Besonders bevorzugt werden Linolsäure (=LA, C<sub>18</sub>:2<sup>Δ9,12</sup>), γ-Linolensäure (= GLA, C<sub>18</sub>:3<sup>Δ6,9,12</sup>), Stearidonsäure (= SDA, C<sub>18</sub>:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>), Dihomo-γ-Linolensäure (= DGLA, 20:3<sup>Δ8,11,14</sup>), ω-3-Eicosatetraensäure (= ETA, C<sub>20</sub>:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Arachidonsäure (ARA, C<sub>20</sub>:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Eicosapentaensäure (EPA, C<sub>20</sub>:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>), oder deren Mischungen synthetisiert, am meisten bevorzugt werden ARA und/oder EPA hergestellt.

Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen können aus den Pflanzen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipiden, Phosphoglyceriden, Lipiden, Glycolipiden wie Glycosphingolipiden, Phospholipiden wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceriden, Diacylglyceriden, Triacylglyceriden oder sonstige Fettsäureestern wie den AcetylCoenzymA-Estern, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs, bevorzugt vier oder fünf Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, bevorzugt werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und freie Fettsäuren) in den Pflanzen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Mono-

glyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird ARA mit einem Gehalt von mindestens 3 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 5 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 8 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 10 Gew.-%, am meisten bevorzugt von mindestens 13 Gew.-%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt in der transgenen Pflanze, hergestellt. EPA wird im erfindungsgemäßen Verfahren mit einem Gehalt von mindestens 0,2%, vorteilhaft von mindestens 0,5%, bevorzugt von mindestens 0,8%, besonders bevorzugt von mindestens 1,0% und am meisten bevorzugt von mindestens 1,2%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt in der transgenen Pflanze, hergestellt.

Dabei werden vorteilhaft C<sub>18</sub>-Fettsäuren, die in den Wirtspflanzen vorhanden sind, zu mindestens 10 %, bevorzugt zu mindestens 20 %, besonders bevorzugt zu mindestens 30 %, am meisten bevorzugt zu mindestens 40 % in die entsprechenden Produkte wie ARA oder EPA umgesetzt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich die ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft herstellten Triglyceride bringen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA) oder Eicosapentaensäure (EPA) nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch geringe Spuren der Vorstufen im Endprodukt enthalten. Sind in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen diese als Gemisch mit den Endprodukten ARA und EPA vor. Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht als 10 Gew.-%, am meisten bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-%, bezogen auf die Menge des jeweiligen Endprodukts, betragen. Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze durch das erfindungsgemäße Verfahren als Endprodukte nur ARA und/oder EPA gebunden oder als

freie Säuren hergestellt. Werden die Verbindungen ARA und EPA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindestens 1:6 (EPA:ARA), vorteilhaft von mindestens 1:8, bevorzugt von mindestens 1:10, besonders bevorzugt von mindestens 1:12 in der Pflanze hergestellt.

Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren, jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen.

Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octa-decatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen, bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu

weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7%, 6 % oder 5%, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 %, bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Durch die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem an ARA und EPA, von mindestens 100 %, bevorzugt von mindestens 300 %, besonders bevorzugt von mindestens 600 %, am meisten bevorzugt von mindestens 900 % gegenüber der nicht transgenen Ausgangspflanze wie *Brassica juncea*, Raps, Arabidopsis oder Lein erreicht werden, wenn die Fettsäuren in der GC-Analyse (siehe Beispiele und Abbildungen) nachgewiesen werden.

Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus den Pflanzen in bekannter Weise, beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharma industrie vorteilhaft.

Als Pflanzen kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind, Fettsäuren zu synthetisieren, wie alle dikotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose. Vorteilhafte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheciaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Cryptecodiniaceae,

Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen wie Tagetes.

Besonders vorteilhaft werden Öl-produzierende Pflanzen verwendet, insbesondere Ölsamen- oder Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Sareptasenf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte.

Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölsamen- oder Ölfruchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Sareptasenf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind Pflanzen, die reich an C18:2- und/oder C18:3-Fettsäuren sind, wie Sonnenblume, Sareptasenf, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Sareptasenf oder Hanf. Am meisten bevorzugt wird Sareptasenf verwendet.

Für das erfindungsgemäße beschriebene Verfahren ist es vorteilhaft, zusätzlich zu den unter Verfahrensschritt (a) bis (c) eingebrachten Nukleinsäuren sowie den ggf. eingebrachten Nukleinsäuresequenzen, die für die Δ-12-Desaturasen kodieren, weitere Nukleinsäuren in die transgene Pflanze einzubringen, die für Enzyme des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels kodieren.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels, vorteilhaft in Kombination mit der erfindungsgemäß verwendeten  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase und  $\Delta$ -12-Desaturase im Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden. Vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der erfindungsgemäß verwendeten  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase und/oder  $\Delta$ -12-Desaturase verwendet.

Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasen oder  $\Delta$ -9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen verwendet.

Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie Polypeptide mit  $\Delta$ -8-Desaturase- oder  $\Delta$ -5- oder  $\Delta$ -9-Elongaseaktivität kodieren, können im erfindungsgemäßen Verfahren unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Pflanzen lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder ARA in freier oder gebundener Form herstellen. Je nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA, oder Fettsäuren, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA,

ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C<sub>18</sub>:2<sup>Δ<sub>9,12</sub></sup>) vor, so können als Produkte des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur α-Linolensäure (= ALA, C<sub>18</sub>:3<sup>Δ<sub>9,12,15</sub></sup>) vorhanden, wie beispielsweise in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA oder EPA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können.

Durch die Aktivität der Δ-6-Desaturase und Δ-6-Elongase entstehen beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangspflanze und darin enthaltener ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder Mischungen daraus. Wird zusätzlich die Δ-5-Desaturase in die Pflanze eingebracht, so entstehen auch ARA und/oder EPA. Vorteilhaft werden nur ARA und/oder EPA oder eine Mischung davon synthetisiert, abhängig von der in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, bevorzugt weniger als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt weniger als 10 Gew.-%, am meisten bevorzugt weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, bezogen auf die Endprodukte DGLA, ETA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA oder deren Mischungen.

Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme direkt in der Pflanze können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus Kostengründen ist die Produktion in der Pflanze bevorzugt. Bevorzugte Substrate für die Produktion von ARA sind die Linolsäure (C<sub>18</sub>:2<sup>Δ<sub>9,12</sub></sup>), die γ-Linolensäure (C<sub>18</sub>:3<sup>Δ<sub>6,9,12</sub></sup>) und die Dihomo-γ-linolensäure (C<sub>20</sub>:3<sup>Δ<sub>8,11,14</sub></sup>). Bevorzugte Substrate für die Produktion von EPA sind die Linolensäure (C<sub>18</sub>:3<sup>Δ<sub>9,12,15</sub></sup>), die Stearidonsäure (C<sub>18</sub>:4<sup>Δ<sub>6,9,12,15</sub></sup>) und die Eicosatetraensäure (C<sub>20</sub>:4<sup>Δ<sub>8,11,14,17</sub></sup>).

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfundungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist. Zusätzlich können weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) im Genkonstrukt enthalten sein. Vorteilhaft sind zusätzlich Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Δ-8-Desaturase, Δ-9-Desaturase, Δ-9-Elongase oder ω-3-Desaturase enthalten.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Δ-5-Desaturase-, Δ-6-Desaturase-, Δ-12-Desaturase- oder Δ-6-Elongase-Aktivität kodieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einer Pflanze ermöglicht, in die Pflanze eingebracht. Es kann im Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie z.B. einer Δ-12-Desaturase, Δ-5-Desaturase, Δ-6-Desaturase und/oder Δ-6-Elongase enthalten sein.

Zum Einbringen der Nukleinsäuren in die Genkonstrukte werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden unter Berücksichtigung der zu amplifizierenden Sequenz ausgewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann nach gelelektrophoretischer Auftrennung

eine quantitative und qualitative Analyse erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung.

Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilzen gewährleisten, und die die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektor-systeme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobakterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatorsequenzen und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in *E. coli* als auch in Agrobacterium zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß werden bevorzugt Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA verwendet. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al., Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451.

Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittene und erforderlichenfalls gereinigte Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten unter Einsatz von Ligase verbunden. Dabei kann ein

bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie Promotoren und Terminatorsequenzen. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere in *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter Selektionsbedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren in Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Transformation von Pflanzen verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225. Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Desaturase-Proteins möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze, bevorzugt in einer Ölsamen- oder Ölfruchtpflanze, aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann. Die Anzahl oder Aktivität der  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere

Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einer Pflanze, der die Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglichen.

Durch das Einbringen einer Kombination von  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Genen in die Pflanze allein oder in Kombination mit anderen Genen kann nicht nur der Biosynthetefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs weiter gesteigert wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl eines oder mehrerer  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, wird die Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen in Pflanzen ermöglicht.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase oder  $\Delta$ -5-Desaturase kodieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und Proteine ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und dadurch die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen können die natürlichen Regulationselemente dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so verändert worden sein, dass ihre natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhaft auch eine oder mehrere sogenannte "Enhancer-Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatorsequenzen.

Die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen in der Wirtspflanze exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es

ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID No. 1, 3, 5, 7 oder deren Derivate definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID No. 2, 4, 6, 8 kodieren. Die genannten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Proteine führen dabei vorteilhaft zu einer Desaturierung oder Elongierung von Fettsäuren, wobei das Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen und vorteilhaft 18 oder 20 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. die in WO 99/16890 beschriebenen.

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren, die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische

Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., Mol. Gen Genet., 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], Conlinin (Lein) [WO 02/102970], Acyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Bäumlein et al., Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 und lpt1(Gerste) [WO 95/15389 u. WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Soja) [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962], Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder  $\alpha$ -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\Delta$ -5-Desaturase kodieren, unter der Kontrolle eines eigenen, bevorzugt eines von den anderen Promotoren verschiedenen, Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zur Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle, vorteilhaft in einem Polylinker, zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt und gegebenenfalls eine Terminatorsequenz hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach,

bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu viermal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über eine geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihre eigene Terminatorsequenz. Derartige vorteilhafte Konstrukte sind beispielsweise in DE 101 02 337 oder DE 101 02 338 offenbart. Es ist aber auch möglich, mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem gemeinsamen Promotor und ggf. vor einer gemeinsamen Terminatorsequenz zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch ihre Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden. Es ist aber auch möglich, nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden, was jedoch zu unerwünschten Rekombinationseignissen führen kann.

Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatorsequenzen am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stopcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. die OCS1-Terminatorsequenz. Wie auch für die Promotoren, so sollten für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Pflanzen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtspflanzen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein.

Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein, diese Gene können aber auch auf einem oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) oder Kombinationen davon verwendet.

Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -9-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -9-Elongase.

Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in Expressionskassetten, wie den vorgenannten, kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen mit Hilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektor eingebracht werden.

Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen oder  $\Delta$ -5-Desaturasen kodieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, das die verwendete Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasen,  $\omega$ 3-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -9-Elongasen enthält.

Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, die an es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife, in die zusätzliche DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch auch andere Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff "Vektor" auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuren oder das beschriebene Genkonstrukt in einer

Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression verwendeten Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfassen. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird).

Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsg.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, die die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, der gewünschten Expressionsstärke des Proteins usw., abhängen kann.

Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens können die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen und/oder  $\Delta$ -5-Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson,

R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und die funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA stammen, wie das als Octopin-synthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktive Terminatorsequenzen sind geeignet.

Da die Regulation der Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebene beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbundene Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

Das zu exprimierende Gen muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebe-spezifische Weise auslöst. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder konstitutive Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erreichen (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignet, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos.

Geeignete Promotoren sind der Napin-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der Conlinin-Promotor aus Lein (WO 02/102970), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, die die samenspezifische Expression in monokotyledonen Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen.

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren sind der virale RNA-Polymerase-Promotor, beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen und/oder  $\Delta$ -5-Desaturasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment, beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen).

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die Nukleinsäuresequenzen mit den SEQ ID No. 1, 3, 5, 7 oder deren Derivate oder Homologe, die für Polypeptide kodieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen kodierten Proteine besitzen, verwendet. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den Nuklein-säuresquenzen, die für die anderen verwendeten Enzyme kodieren, in Expressionskonstrukte kloniert und zur Transformation und Expression in Pflanzen verwendet. Diese Expressions-

konstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder einer ganzen Pflanze, die die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder die Pflanze mit einer Nuklein-säuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer Δ-12-Desaturase, Δ-5-Desaturase, Δ-6-Desaturase und/oder Δ-6-Elongase-Aktivität kodiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie vorstehend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels kodieren, transformiert wird. Die so hergestellte Zelle ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Färbersaflor, Hanf, Senf, Sonnenblumen oder Borretsch.

"Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die Nukleinsäuresequenz oder einer Pflanze transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassetten oder Vektoren alle diejenigen durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die verwendeten Nukleinsäuresequenzen, oder
- b) eine mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) a) und b)

nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei es sich bei der Modifikation beispielhaft um eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste

handeln kann. Unter der natürlichen genetischen Umgebung wird der natürliche genomische bzw. chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder in einer genomischen Bibliothek verstanden. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt von mindestens 500 bp, besonders bevorzugt von mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt von mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden Δ-12-Desaturase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-6-Desaturase- und/oder Δ-6-Elongasegenen – wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise eine Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Unter einer transgenen Pflanze im Sinne der Erfindung ist daher zu verstehen, dass sich die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom der Pflanze befinden, wobei die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden können. Transgen bedeutet aber auch, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Pflanzen sind Ölsamen- oder Ölfruchtpflanzen.

Als Pflanzen zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Pflanzen, die in der Lage sind, Fettsäuren, speziell ungesättigte Fettsäuren, zu synthetisieren und die für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft

seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Sareptasenf, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne genannt. Bevorzugt werden Pflanzen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Soja, Raps, Sareptasenf, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, Färbersaflor, Sonnenblume, Sareptasenf oder Calendula.

Weitere nutzbare Wirtszellen sind genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Hierzu gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, die von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet sind und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen.

Transgene Pflanzen, die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden, ohne dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe, Zellkulturen, die sich von der transgenen Pflanze ableiten und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen, zu verstehen. Der

Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe.

Grundsätzlich eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, insbesondere von ARA und EPA in pflanzlichen Zellkulturen und anschließender Gewinnung der Fettsäuren aus den Kulturen. Dabei kann es sich insbesondere um Suspensions- oder Kalluskulturen handeln.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in eine Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder vorteilhaft in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufällig gemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multi-parallelen Expression, vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

Die Co-Expression mehrerer Gene kann natürlich nicht nur durch Einbringen der Gene auf einem gemeinsamen rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt erfolgen. Vielmehr können einzelne Gene auch separat – gleichzeitig oder nacheinander – auf verschiedenen Konstrukten eingebracht werden. Hier wird z.B. durch die Verwendung verschiedener Selektionsmarker die gleichzeitige Anwesenheit in der alle Gene co-exprimierenden Pflanze sichergestellt. Diese Pflanze kann das Produkt eines oder mehrerer Transformationsvorgänge sein, oder aber auch ein Kreuzungsprodukt von Pflanzen, die eines oder mehrere der Gene enthalten.

Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) kodieren, eignen sich vorteilhaft C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren. Die Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C<sub>18</sub>- und/oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren vorteilhaft mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen, am meisten bevorzugt mit vier oder fünf Doppelbindungen im Molekül. Besonders bevorzugte Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Arachidonsäure und/oder Eicosapentaensäure. Die C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide,

Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Pflanzen prinzipiell auf zwei Arten erhöht werden. Es kann entweder der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Organismen erhöht.

Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie

Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Pflanzenzellen, vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Ölsamen- oder Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Saflor, Sareptasenf, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplame, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Sareptasenf, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Saflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFA in transgenen Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola, Sareptasenf und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder können eine indirekte Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der PUFA oder einer Abnahme unerwünschter

Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).

Besonders zur Herstellung von PUFA, bevorzugt von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure, eignen sich Brassicaceen, Boraginaceen, Primulaceen, oder Linaceen. Besonders geeignet zur Herstellung von PUFA mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, vorteilhaft, wie beschrieben, in Kombination mit weiteren Desaturasen und Elongasen, sind Sareptasenf (*Brassica juncea*) und Raps.

Mit Hilfe der im Verfahren verwendeten Desaturasen wie der  $\Delta$ -12-,  $\Delta$ -5- und  $\Delta$ -6-Desaturasen und/oder der  $\Delta$ -6-Elongase können Arachidonsäure und Eicosapentaensäure hergestellt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können  $C_{20}$ -Fettsäuren mit mindestens zwei, bevorzugt mindestens drei, vier oder fünf, und besonders bevorzugt mindestens vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFA mit höherem Desaturierungsgrad, zu Fettsäuren wie  $\gamma$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten PUFA umfassen somit eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht oder nicht mehr ausreichend synthetisieren können und daher über die Nahrung aufnehmen müssen.

Substrate der verwendeten Desaturasen und Elongasen im erfindungsgemäßen Verfahren sind  $C_{18}$ - oder  $C_{20}$ -Fettsäuren wie zum Beispiel Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure,  $\alpha$ -Linolensäure,

Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Eicosatetraensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure und/oder  $\alpha$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure oder Eicosatetraensäure. Die synthetisierten C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus der Pflanze oder aus der Kultur. Bei der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Treibhaus- oder Feldkultur einer Pflanze handeln.

Das Isolieren der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren kann über Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile, bevorzugt der Pflanzensamen, erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile, speziell die Samen, leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst oder mit Lösungsmitteln wie warmem Hexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt.

Danach werden die so erhaltenen Produkte weiter bearbeitet, das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst beispielsweise die Pflanzenschleime und Trübstoffe entfernt. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base, beispielsweise Natronlauge, entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen, werden die Produkte einer Bleichung beispielsweise mit Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf desodoriert.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs bzw. LCPUFAs C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuremoleküle, vorteilhaft C<sub>20</sub>-Fettsäuremoleküle mit mindestens drei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, besonders bevorzugt mit vier oder fünf Doppelbindungen. Diese C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuremoleküle lassen sich aus der Pflanze in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Pflanzen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten.

Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öle, Lipide oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäßen Öle, Lipide oder Fettsäuren mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, bevorzugt mindestens 6%, 7%, 8%, 9% oder 10%, besonders bevorzugt mindestens 11%, 12%, 13% oder 14% ARA und/oder mindestens 0,2%, 0,5%, 0,8%, bevorzugt mindestens 1%, oder besonders bevorzugt mindestens 1,2% EPA bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der Pflanze, besonders vorteilhaft einer Ölsamen- oder Ölfruchtpflanze wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Sareptasenf, Erdnuss, Kakaobohne, Sonnenblume oder den oben genannten weiteren ein- oder zweikeimblättrigen Ölfruchtpflanzen.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden. Auch diese Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische, die aus pflanzlichen und tierischen Bestandteilen bestehen, können zur Herstellung von Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden.

Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte oder gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Arachidonsäure,  $\alpha$ -Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 40 %, besonders bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, am meisten bevorzugt ist ein Anteil von 70 %, 80 %, 85 % oder mehr. Der Anteil der Fettsäure kann z.B. nach Überführung der Fettsäuren in die Methylester durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangspflanze der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäureestern, die vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, handelt es sich wie oben beschrieben beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.

Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäureestern lassen sich die enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit vorteilhaft vier oder fünf Doppelbindungen beispielsweise über eine Alkalibehandlung, beispielsweise mit wässriger KOH oder NaOH, oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und über beispielsweise Phasentrennung und anschließende Ansäuerung über z.B. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> isolieren. Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch aus verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfundungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschriebenen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

Unter Phospholipiden im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol, vorteilhafterweise Phosphatidylcholin.

Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und bezeichnen die Konzentration des Fermentationsproduktes (Verbindungen der Formel I), das in einem bestimmten Zeitraum und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Sie umfassen auch die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, das heißt den Gehalt an den gewünschten im Verfahren hergestellten Fettsäuren bezogen auf den Gehalt an allen Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch

Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht.

Die Begriffe "Biosynthese" oder "Biosyntheseweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess.

Die Begriffe "Abbau" oder "Abbauweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess.

Der Begriff "Stoffwechsel" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst somit die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiele:

Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose- und Nylon-

Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli*-Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente, die durch eine Polymerase Kettenreaktion erhalten wurden, wurden sequenziert und überprüft, um auszuschließen, dass durch Polymerasfehler Mutationen im Konstrukt, das exprimiert werden soll, auftreten.

Beispiel 3: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al., Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451. Verwendet wurde ein pGPTV-Derivat wie in DE10205607 beschrieben. Dieser Vektor unterscheidet sich von pGPTV durch eine zusätzlich eingefügte *Ascl*-Restriktionsschnittstelle.

Ausgangspunkt der Klonierung war der Klonierungsvektor pUC19 (Maniatis et al.). Im ersten Schritt wurde das Conlinin-Promotor-Fragment mit folgenden Primern amplifiziert:

Cn11 C 5': gaattcggcgccgagtcctcgagcaacgggtccggcggtatagagttggtaattcga

Cn11 C 3': cccggatcgatgccggcagatctccaccattttgggtgat

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym EcoRI und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym SmaI inkubiert. Der Klonierungsvektor pUC19 wurde in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der 2668 bp große, geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1-C wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Im nächsten Schritt wurde der OCS-Terminator (Genbank Accession V00088; De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982)) aus dem Vektor pGPVT-USP/OCS (DE 102 05 607) mit den folgenden Primern amplifiziert:

OCS\_C 5': aggccctccatggcctgcttaatgagatatgcgagacgcc

OCS\_C 3': cccgggcccggacaatcagtaaattgaacggag

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1-C wurde 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_OCS wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Im nächsten Schritt wurde der Cnl1-B Promotor durch PCR mittels folgender Primer amplifiziert:

Cnl1-B 5': aggcctcaacgggtccggcggtata

Cnl1-B 3': cccggggtaacgctagcggcccgatatcgatcccatttttgtggtattggttct

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1-C wurde 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_OCS wurde durch Sequenzierung verifiziert.

In einem weiteren Schritt wurde der OCS-Terminator für Cnl1B eingefügt. Dazu wurde die PCR mit folgenden Primer durchgeführt:

OCS2 5': aggcctcctgcttaatgagatatgcgagac

OCS2 3': cccgggcggacaatcagtaattgaacggag

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_OCS wurde für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_OCS2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Im nächsten Schritt wurde der Cnl1-A Promotor durch PCR mittels folgender Primer amplifiziert:

Cnl1-B 5': aggcctcaacgggtccggcggtatagag

Cnl1-B 3': aggccttctagactgcaggcggccgcattttgggtgattgg

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1-C wurde für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

In einem weiteren Schritt wurde der OCS-Terminator für Cnl1A eingefügt. Dazu wurde die PCR mit folgenden Primer durchgeführt:

OCS2 5': ggcctcctgcttaatgagatatgcga

OCS2 3': aagcttggcgccgagctcgacggacaatcagtaattgaacggaga

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Hind*III inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS2 wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Hind*III inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3 wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der Δ6-, Δ5-Desaturase und Δ6-Elongase verwendet. Dazu wurde die Δ6-Desaturase aus *Phytium irregulare* (WO02/26946) mit folgenden PCR-Primern amplifiziert:

D6Des(Pir) 5': agatctatggtgaccaaggcctggagtg

D6Des(Pir) 3': ccatggccgggttacatcgctggaaactcggtgat

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Nco*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3 wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Nco*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir) wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der  $\Delta 5$ -Desaturase aus Thraustochytrium ssp. (WO02/26946) verwendet. Dazu wurde die  $\Delta 5$ -Desaturase aus Thraustochytrium ssp. mit folgenden PCR-Primern amplifiziert:

D5Des(Tc) 5': gggatccatgggcaaggcgagcgagggccg

D5Des(Tc) 3': ggccgcgacaccaagaagaaggactgagatatc

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50  $\mu$ l):

5,00  $\mu$ l Template cDNA

5,00  $\mu$ l 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00  $\mu$ l 2mM dNTP

1,25  $\mu$ l je Primer (10 pmol/ $\mu$ l)

0,50  $\mu$ l Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym BamHI und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym EcoRV inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir) wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym BamHI und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym EcoRV inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und

PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc) wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der Δ6-Elongase aus *Physcomitrella patens* (WO01/59128) verwendet, wozu diese mit folgenden PCR-Primern amplifiziert wurde:

D6Elo(Pp) 5': gcggccgcatggaggtcgtagagattctacggtg

D6Elo(Pp) 3': gcaaaaggagctaaaactgagtgtatctaga

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *NotI* und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *XbaI* inkubiert. Der Vektor

pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc) wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *NotI* und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *XbaI* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ausgehend von pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurde der binäre Vektor für die Pflanzentransformation hergestellt. Dazu wurde

pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Ascl* inkubiert. Der Vektor pGPTV wurde in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden das Fragment aus pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) und der geschnittene pGPTV-Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pGPTV- Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ein weiteres Konstrukt, pGPTV- Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co), fand Verwendung. Dazu wurde ausgehend von pUC19-Cnl1C\_OCS mit folgenden Primern amplifiziert:

Cnl1\_OCS 5': gtcgatcaacgggtccggcggtatagagttg

Cnl1\_OCS 3': gtcgatcgacaaatcagtaattgaacggaga

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *SaII* inkubiert. Der Vektor pUC19 wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *SaII* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_OCS wurde durch Sequenzierung verifiziert.

In einem weiteren Schritt wurde das Δ12-Desaturase-Gen aus *Calendula officinalis* (WO01/85968) in pUC19-Cnl1\_OCS kloniert. Dazu wurde d12Des(Co) mit folgenden Primern amplifiziert:

D12Des(Co) 5': agatctatgggtgcaggcggtcgaatgc

D12Des(Co) 3': ccatggtaaatcttattacgatacc

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA

5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µl 2mM dNTP

1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)

0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bg*II und anschließend für 2 h bei gleicher Temperatur mit *Nco*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1\_OCS wurde in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Fragment und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_D12Des(Co) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid pUC19-Cnl1\_D12Des(Co), sowie das Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurden für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Sa*II inkubiert. Anschließend wurde das Vektor-Fragment sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und Vektor-

Fragment ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cn11\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ausgehend von pUC19-Cn11\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) wurde der binäre Vektor für die Pflanzentransformation hergestellt. Dazu wurde pUC19-Cn11\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Ascl* inkubiert. Der Vektor pGPTV wurde in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden das Fragment aus pUC19-Cn11\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) und der geschnittene pGPTV-Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pGPTV-Cn11\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

#### Beispiel 4: Erzeugung von transgenen Pflanzen

- Erzeugung transgener Sareptasenfpflanzen. Es wurde das Protokoll zur Transformation von Rapspflanzen verwendet (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

Zur Erzeugung transgener Pflanzen wurden binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Sareptasenfpflanzen wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-

Medium) verwendet. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Coinkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde anschließend mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikroM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln dem Medium zugegeben.

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Elongase-Expression wie Δ-6-Elongaseaktivität oder Δ-5- oder Δ-6-Desaturaseaktivität mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an C20- und C22 mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurden so identifiziert.

Mit diesem Protokoll wurden auch transgene Rapspflanzen erfolgreich hergestellt.

b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

Die transgenen Leinpflanzen können zum Beispiel nach der Methode von Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6):456-465 mittels particle bombardment erzeugt werden. Agrobakterien-vermittelte Transformationen können zum Beispiel nach Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285 durchgeführt werden.

### Beispiel 5: Lipidextraktion aus Samen:

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet wird und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. der Lipide oder einer Fettsäure) untersucht werden. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browne et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145 beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research,

Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1

Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan für 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

Abbildungen:

1. Synthesewege zur Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren
2. Gaschromatographische Analyse der Lipide aus dem Samen von transgenen *B. juncea* Pflanzen, die mit dem Konstrukt pGPTV-D6Des(Pir)\_D5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) transformiert worden waren, im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrollpflanze
3. Gaschromatographische Analyse der Lipide aus dem Samen von transgenen *B. juncea* Pflanzen, die mit dem Konstrukt pGPTV-D6Des(Pir)\_D5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) transformiert worden waren, im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrollpflanze.

Tabelle 1: Verteilung der Fettsäuren in den Samen in drei verschiedenen transgenen B.juncea Linien.

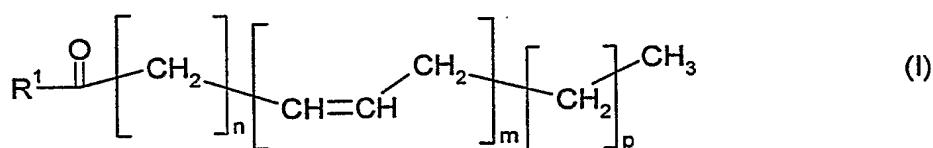
B. juncea lines	No.	18:1	18:2	g18:3 GLA	a18:3	18:4 SDA	20:3	20:4 ARA
WT	1	33,2	38,2	0	13,2	0	0	0
	2	31,3	41,2	0	11,7	0	0	0
8-1424-5	1	25,1	12,8	26,4	3,5	2,4	0,6	8,3
	2	26	12,7	26,3	3,8	2,6	0,6	8,2
	3	25	12,5	25,9	3,4	2,4	0,8	8,5
8-1424-8	1	28,1	13,1	25	5,8	3,7	0,2	6,2
	3	24,7	14,8	26,4	5,2	3	0,3	6,8
8-1424-10	1	25,2	14,2	29,8	5,2	3,4	0,5	5
	2	27,2	12,7	27,9	4,2	2,9	0,3	6,3

Tabelle 2: Verteilung der Fettsäuren in den Samen in drei verschiedenen transgenen B.juncea Linien.

Sample	18:1 -9	18:2- 6,9	18:2- 9,12	18:3- 6,9,12	18:3- 9,12,15	18:4- 6,9,12,15	20:3- 8,11,14	20:4- 5,8,11,14	20:4- 8,11,14,17	20:5*- 5,8,11,14,17
WT #1	35.10	0.00	35.71	0.00	10.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#2	27.79	0.00	32.83	0.00	8.94	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00
9-1424-1-#1	17.62	1.07	12.32	29.92	2.84	2.17	0.97	13.05	<0.01	1.21
#2	23.68	2.17	10.57	23.70	2.39	1.80	0.98	11.60	<0.01	1.16
#3	17.15	0.94	12.86	31.16	3.19	2.40	1.01	12.09	<0.01	1.16
9-1424-5-#1	16.48	1.47	11.09	30.49	3.06	2.56	0.75	11.84	<0.01	1.24
#2	17.70	1.23	11.42	27.94	2.35	1.88	0.64	12.30	0.03	1.12
#3	19.29	1.05	10.95	26.11	2.85	2.11	1.07	12.09	<0.01	1.21
9-1424-6-#1	24.71	0.00	41.87	0.00	12.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#2	28.84	0.00	40.65	0.00	10.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#3	29.28	0.00	41.34	0.00	10.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9-1424-7-#1	32.41	0.00	37.26	0.00	10.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#2	27.76	0.00	36.66	0.00	11.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#3	32.03	0.00	36.27	0.00	9.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9-1424-8-#1	19.08	0.61	11.26	23.31	3.73	2.14	1.11	10.93	0.08	1.11
#2	20.34	3.78	10.07	19.59	2.36	1.72	0.68	8.21	<0.01	1.00
#3	28.27	0.00	37.19	0.00	9.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9-1424-9-#1	25.95	0.00	37.87	0.00	9.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#2	22.94	0.00	42.69	0.00	9.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
#3	18.96	0.61	14.09	23.76	3.17	1.86	0.97	13.43	<0.01	1.54

## P A T E N T A N S P R Ü C H E

### 1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I:

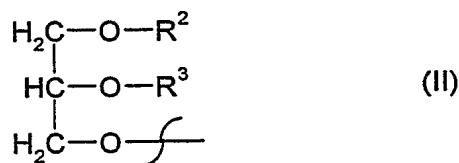


in transgenen Pflanzen, umfassend:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer Δ-6-Desaturase-Aktivität kodiert und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 1 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer Δ-6-Elongase-Aktivität kodiert und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 3 dargestellten Sequenz,

- ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 4 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 3 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind, und
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer Δ-5-Desaturase-Aktivität kodiert und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 5 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 6 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 5 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 5 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,

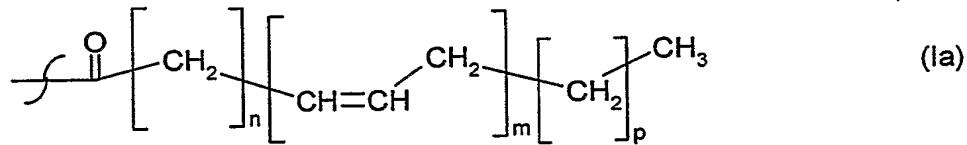
wobei R<sup>1</sup> = Hydroxyl, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder ein Rest der allgemeinen Formel II



wobei  $\text{R}^2$  = Wasserstoff, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-

Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-, und

$\text{R}^3$  = Wasserstoff, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-, oder  $\text{R}^2$  oder  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ , darstellen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Substituenten  $\text{R}^2$  oder  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl bedeuten.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Substituenten  $\text{R}^2$  oder  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander ungesättigtes C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl mit mindestens zwei Doppelbindungen bedeuten.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz in die Pflanze eingebracht wird, die für ein Polypeptid mit einer Δ-12-Desaturase-Aktivität kodiert.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No. 7 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID No. 8 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
- c) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 7 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID No. 7 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die  $\Delta$ -12-Desaturase unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimiert wird.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei alle Nukleinsäuresequenzen auf einem gemeinsamen rekombinanten Nukleinsäuremolekül in die Pflanzen eingebracht werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei jede Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines eigenen Promotors steht.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei es sich bei dem eigenen Promotor um einen samenspezifischen Promotor handelt.

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei in der Formel I  $m = 4, n = 3, p = 3$  und die Verbindung Arachidonsäure ist und/oder  $m = 5, n = 3, p = 0$  und die Verbindung Eicosapentaensäure ist.

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei es sich bei der Pflanze um eine Ölsamen- oder Ölfruchtpflanze handelt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Wildrosen, Kürbis, Pistazien, Sesam, Sonnenblume, Färberdistel, Borretsch, Mais, Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Ölpalme, Walnuss und Kokosnuss.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Pflanze *Brassica juncea* ist.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Verbindungen der Formel I in Form ihrer Öle, Lipide und freien Fettsäuren aus der Pflanze gewonnen werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei aus den Verbindungen der Formel I ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren freigesetzt werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Freisetzung durch alkalische Hydrolyse oder enzymatische Abspaltung erfolgt.

17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Konzentration von Arachidonsäure mindestens 3%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der transgenen Pflanze, beträgt.

18. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, erhalten durch ein Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche.

19. Verwendung einer  $\Delta$ -6-Desaturase, einer  $\Delta$ -5-Desaturase und einer  $\Delta$ -6-Elongase, wie in Anspruch 1 definiert, zur Herstellung von Verbindungen der Formel I.
20. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend:
- a) eine oder mehrere Kopien eines in Pflanzenzellen, bevorzugt in Samenzellen, aktiven Promotors,
  - b) mindestens eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 1 definiert, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität kodiert,
  - c) mindestens eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 1 definiert, die für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität kodiert,
  - d) mindestens eine Nukleinsäuresequenz enthält wie in Anspruch 1 definiert, die für eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert, und
  - e) eine oder mehrere Kopien einer Terminatorsequenz.
21. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 20, zusätzlich umfassend eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 5 definiert, die für eine  $\Delta$ -12-Desaturase kodiert.
22. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 20 oder 21, zusätzlich umfassend Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lyo-phospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen und Fettsäure-Elongase(n).
23. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 19 bis 22, zusätzlich enthaltend Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus

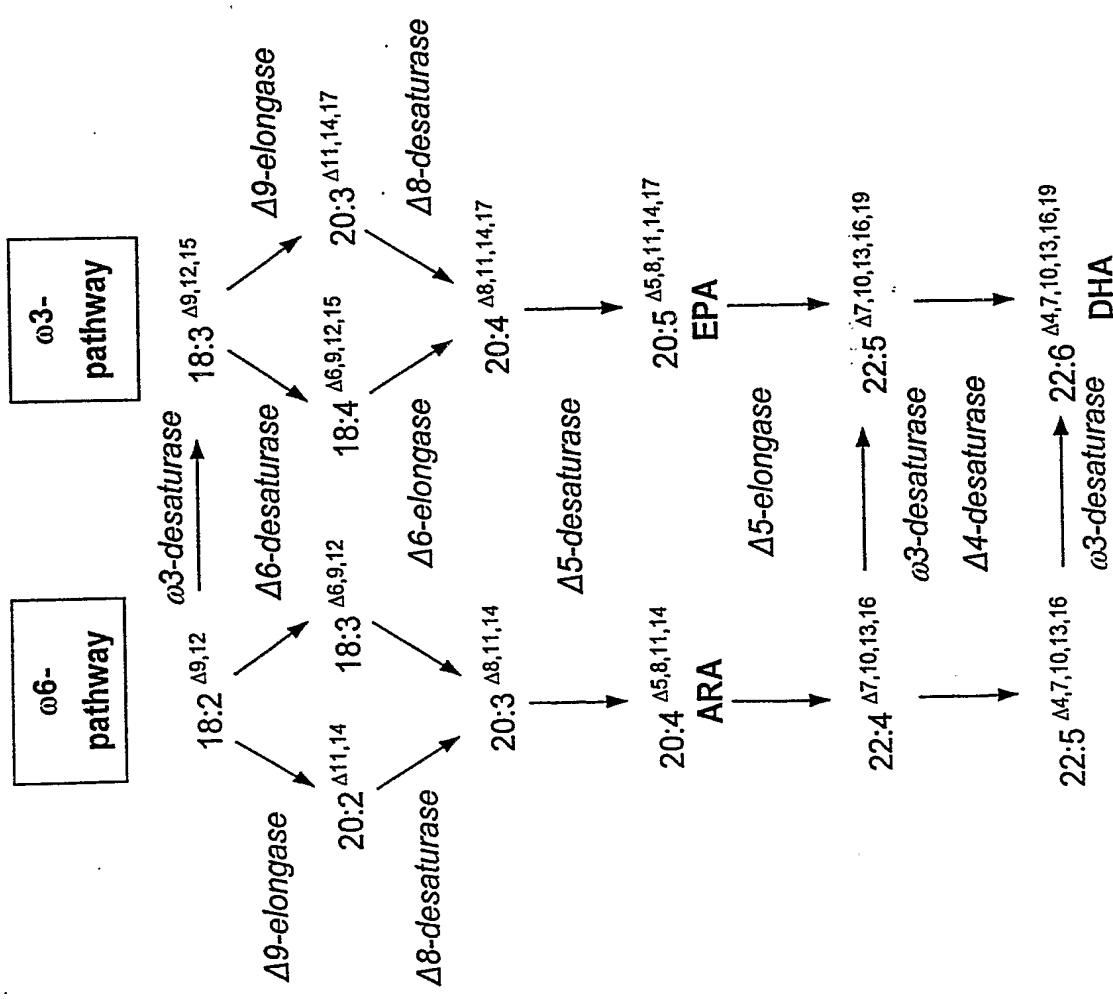
der Gruppe bestehend aus  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase- oder  $\Delta$ -9-Elongase.

24. Transgene Pflanze enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 20 bis 23 oder enthaltend die in Anspruch 1 und ggf. zusätzlich die in Anspruch 5 definierten Nukleinsäuresequenzen.

## Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer transgenen Pflanze, indem gleichzeitig Nukleinsäuresequenzen in die Pflanze eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität kodieren. Bei den Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um die in SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 5 dargestellten Sequenzen. Bevorzugt wird zusammen mit diesen Nukleinsäuresequenzen eine weitere Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodiert, in die Pflanze eingebracht. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei um die in SEQ ID No. 7 dargestellte Nukleinsäuresequenz.

Abb 1: Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren



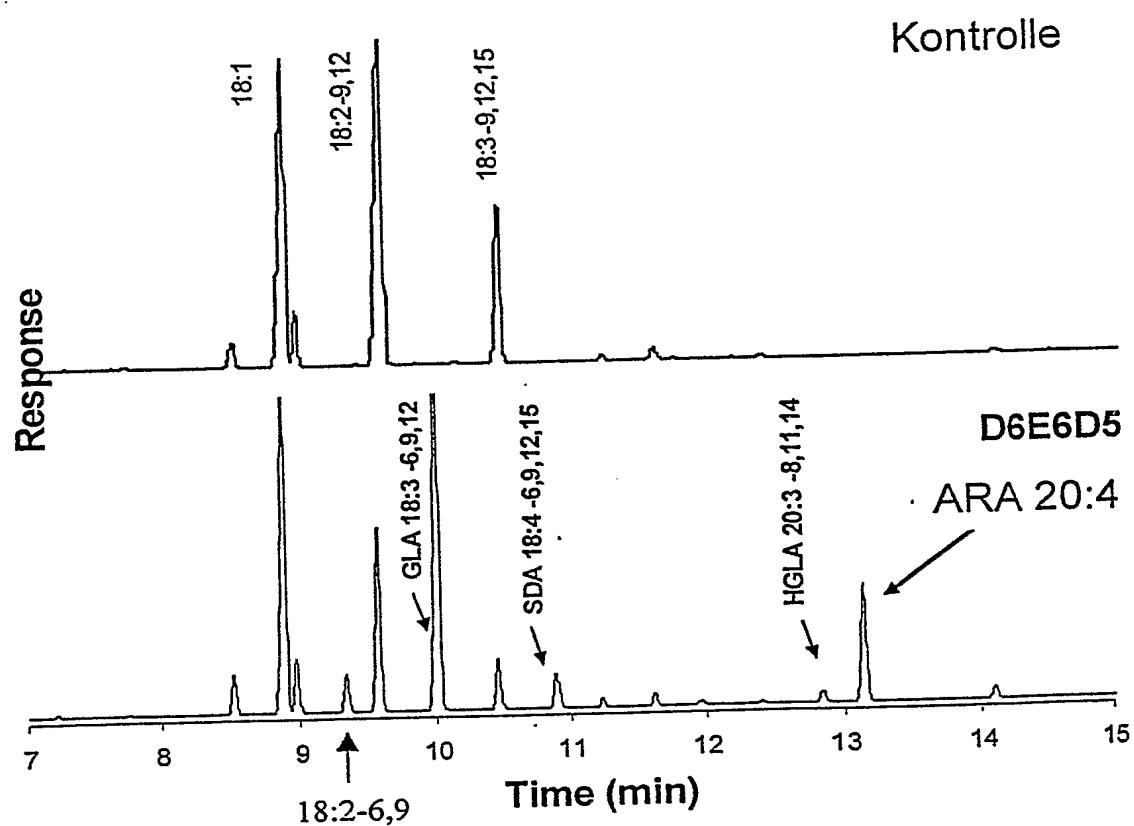


Abb. 2

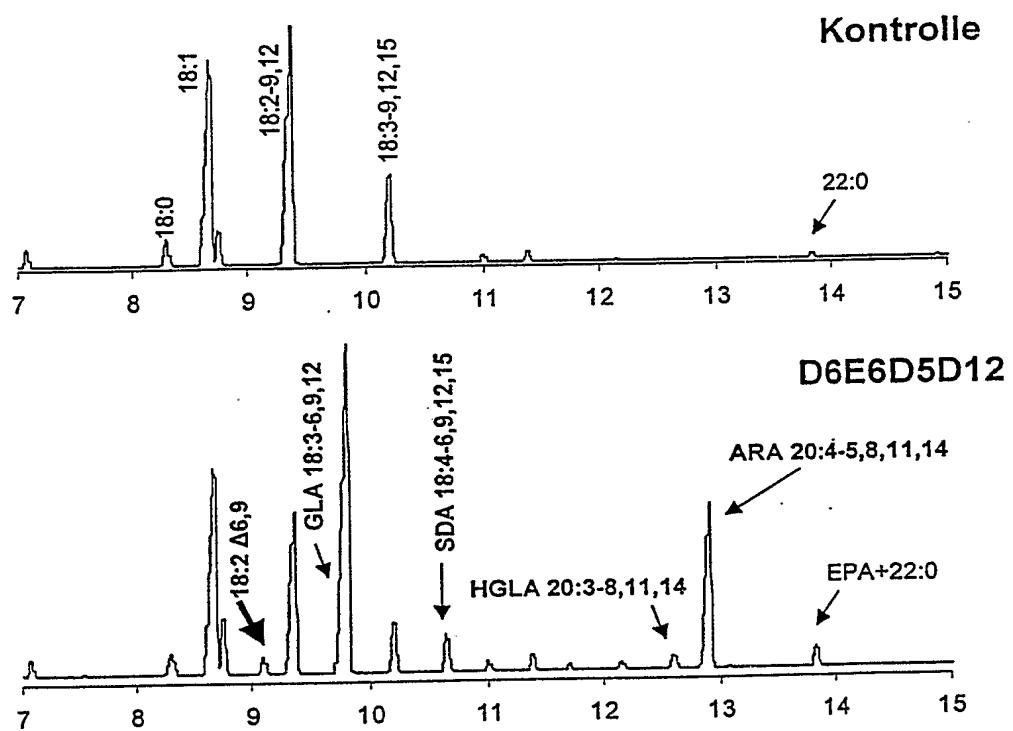


Abb. 3

B7662.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> BASF AG

<120> Method for the production of polyunsaturated fatty acids

<130> B 7662

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1380

<212> DNA

<213> Phytiun irregularae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1377)

<400> 1		48
atg gtg gac ctc aag cct gga gtg aag cgc ctg gtg agc tgg aag gag		
Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu		
1 5 10 15		
atc cgc gag cac gcg acg ccc gcg acc gcg tgg atc gtg att cac cac		96
Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His		
20 25 30		
aag gtc tac gac atc tcc aag tgg gac tcg cac ccg ggt ggc tcc gtg		144
Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val		
35 40 45		
atg ctc acg cag gcc ggc gag gac gcc acg gac gcc ttc gcg gtc ttc		192
Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe		
50 55 60		
cac ccg tcc tcg gcg ctc aag ctg ctc gag cag ttc tac gtc ggc gac		240
His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp		
65 70 75 80		
gtg gac gaa acc tcc aag gcc gag atc gag ggg gag ccg gcg agc gac		288
Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp		
85 90 95		
gag gag cgc gcg cgc cgc gag cgc atc aac gag ttc atc gcg tcc tac		336
Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr		
100 105 110		
cgc cgt ctg cgc gtc aag gtc aag ggc atg ggg ctc tac gac gcc agc		384
Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser		
115 120 125		
gcg ctc tac tac gcg tgg aag ctc gtg agc acg ttc ggc atc gcg gtg		432
Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val		
130 135 140		
ctc tcg atg gcg atc tgc ttc ttc aac agt ttc gcc atg tac atg		480
Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met		
145 150 155 160		
gtc gcc ggc gtg att atg ggg ctc ttc tac cag cag tcc gga tgg ctg		528
Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu		
165 170 175		
gcg cac gac ttc ttg cac aac cag gtg tgc gag aac cgc acg ctc ggc		576

B7662.ST25.txt  
 Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly  
 180 185 190

aac ctt atc ggc tgc ctc gtg ggc aac gcc tgg cag ggc ttc agc atg 624  
 Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Met  
 195 200 205

cag tgg tgg aag aac aag cac aac ctg cac cac gcg gtg ccg aac ctg 672  
 Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His Ala Val Pro Asn Leu  
 210 215 220

cac agc gcc aag gac gag ggc ttc atc ggc gac ccg gac atc gac acc 720  
 His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr  
 225 230 235 240

atg ccg ctg ctg gcg tgg tct aag gag atg gcg cgc aag gcg ttc gag 768  
 Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu  
 245 250 255

tcg gcg cac ggc ccg ttc ttc atc cgc aac cag gcg ttc cta tac ttc 816  
 Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe  
 260 265 270

ccg ctg ctg ctg ctc gcg cgc ctg agc tgg ctc gcg cag tcg ttc ttc 864  
 Pro Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe  
 275 280 285

tac gtg ttc acc gag ttc tcg ttc ggc atc ttc gac aag gtc gag ttc 912  
 Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe  
 290 295 300

gac gga ccg gag aag gcg ggt ctg atc gtg cac tac atc tgg cag ctc 960  
 Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu  
 305 310 315 320

gcg atc ccg tac ttc tgc aac atg agc ctg ttt gag ggc gtg gca tac 1008  
 Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr  
 325 330 335

ttc ctc atg ggc cag gcg tcc tgc ggc ttg ctc ctg gcg ctg gtg ttc 1056  
 Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe  
 340 345 350

agt att ggc cac aac ggc atg tcg gtg tac gag cgc gaa acc aag ccg 1104  
 Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro  
 355 360 365

AS: ttc tgg cag ctg cag gtg acc acg acg cgc aac atc cgc gcg tcg 1152  
 Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser  
 370 375 380

gta ttc atg gac tgg ttc acc ggt ggc ttg aac tac cag atc gac cat 1200  
 Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His  
 385 390 395 400

cac ctg ttc ccg ctc gtg ccg cgc cac aac ttg cca aag gtc aac gtg 1248  
 His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val  
 405 410 415

ctc atc aag tcg cta tgc aag gag ttc gac atc ccg ttc cac gag acc 1296  
 Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr  
 420 425 430

ggc ttc tgg gag ggc atc tac gag gtc gtg gac cac ctg gcg gac atc 1344  
 Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile  
 435 440 445

agc aag gaa ttt atc acc gag ttc cca gcg atg taa 1380

B7662.ST25.txt  
Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met  
450 455

<210> 2  
<211> 459  
<212> PRT  
<213> Phytium irregularе

<400> 2

Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu  
1 5 10 15

Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His  
20 25 30

Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val  
35 40 45

Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe  
50 55 60

His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp  
65 70 75 80

Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp  
85 90 95

Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr  
100 105 110

Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser  
115 120 125

Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val  
130 135 140

Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met  
145 150 155 160

Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu  
165 170 175

Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly  
180 185 190

Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Met  
195 200 205

Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu  
210 215 220

His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr

225

230

B7662.ST25.txt  
235

240

Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu  
245 250 255

Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe  
260 265 270

Pro Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe  
275 280 285

Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe  
290 295 300

Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu  
305 310 315 320

Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr  
325 330 335

Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe  
340 345 350

Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro  
355 360 365

Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser  
370 375 380

Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His  
385 390 395 400

His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val  
405 410 415

Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr  
420 425 430

Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile  
435 440 445

Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met  
450 455

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 873

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Physcomitrella patens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(870)

B7662.ST25.txt

<400> 3  
 atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 48  
 Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
 1 5 10 15  
 cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat 96  
 Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
 20 25 30  
 acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc 144  
 Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
 35 40 45  
 gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg 192  
 Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
 50 55 60  
 tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg 240  
 Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
 65 70 75 80  
 ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt 288  
 Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
 85 90 95  
 ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cggt tac 336  
 Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
 100 105 110  
 tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att 384  
 Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
 115 120 125  
 ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc 432  
 Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
 130 135 140  
 gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc cac 480  
 Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
 145 150 155 160  
 gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat 528  
 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
 165 170 175  
 cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga 576  
 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
 180 185 190  
 gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga 624  
 Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
 195 200 205  
 agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg 672  
 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
 210 215 220  
 aca cca ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac 720  
 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att 768  
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
 245 250 255  
 ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac 816  
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr

## B7662.ST25.txt

260

265

270

864

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa  
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
 275 280 285

873

act gag tga  
 Thr Glu  
 290

<210> 4  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> Physcomitrella patens

&lt;400&gt; 4

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
 195 200 205

B7662.ST25.txt

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr  
 260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
 275 280 285

Thr Glu  
 290

<210> 5  
 <211> 1320  
 <212> DNA  
 <213> Thraustochytrium ssp.

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1317)

<400> 5 atg ggc aag ggc agc gag ggc cgc agc gcg gcg cgc gag atg acg gcc Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala 1 5 10 15	48
gag gcg aac ggc gac aag cgg aaa acg att ctg atc gag ggc gtc ctg Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu 20 25 30	96
tac gac gcg acg aac ttt aag cac ccg ggc ggt tcg atc atc aac ttc Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe 35 40 45	144
ttg acc gag ggc gag gcc ggc gtg gac gcg acg cag gcg tac cgc gag Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu 50 55 60	192
ttt cat cag cgg tcc ggc aag gcc gac aag tac ctc aag tcg ctg ccg Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro 65 70 80	240
aag ctg gat gcg tcc aag gtg gag tcg cgg ttc tcg gcc aaa gag cag Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln 85 90 95	288
gcg cgg cgc gac gcc atg acg cgc gac tac gcg gcc ttt cgc gag gag Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu 100 105 110	336
ctc gtc gcc gag ggg tac ttt gac ccg tcg atc ccg cac atg att tac Leu Val Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Tyr 115 120 125	384

B7662.ST25.txt

cgc gtc gtg gag atc gtg gcg ctc ttc gcg ctc tcg ttc tgg ctc atg Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met 130 135 140	432
tcc aag gcc tcg ccc acc tcg ctc gtg ctg ggc gtg gtg atg aac ggc Ser Lys Ala Ser Pro Thr Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly 145 150 155 160	480
att gcg cag ggc cgc tgc ggc tgg gtc atg cac gag atg ggc cac ggg Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly 165 170 175	528
tcg ttc acg ggc gtc atc tgg ctc gac gac cgg atg tgc gag ttc ttc Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Asp Arg Met Cys Glu Phe Phe 180 185 190	576
tac ggc gtc ggc tgc ggc atg agc ggg cac tac tgg aag aac cag cac Tyr Gly Val Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His 195 200 205	624
agc aag cac cac gcc gcg ccc aac cgc ctc gag cac gat gtc gat ctc Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu 210 215 220	672
aac acg ctg ccc ctg gtc gcc ttt aac gag cgc gtc gtg cgc aag gtc Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val 225 230 235 240	720
aag ccg gga tcg ctg ctg gcg ctc tgg ctg cgc gtg cag ggc tac ctc Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu 245 250 255	768
ttt gcg ccc gtc tcg tgc ctg ctc atc ggc ctt ggc tgg acg ctc tac Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr 260 265 270	816
ctg cac ccg cgc tac atg ctg cgc acc aag cgg cac atg gag ttc gtc Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val 275 280 285	864
tgg atc ttc gcg cgc tac att ggc tgg ttc tcg ctc atg ggc gct ctc Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu 290 295 300	912
ggc tac tcg ccg ggc acc tcg gtc ggg atg tac ctg tgc tcg ttc ggc Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly 305 310 315 320	960
ctc ggc tgc att tac att ttc ctg cag ttc gcc gtc agc cac acg cac Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His 325 330 335	1008
ctg ccg gtg acc aac ccg gag gac cag ctg cac tgg ctc gag tac gcg Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala 340 345 350	1056
gcc gac cac acg gtg aac att agc acc aag tcc tgg ctc gtc acg tgg Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp 355 360 365	1104
tgg atg tcg aac ctg aac ttt cag atc gag cac cac ctc ttc ccc acg Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr 370 375 380	1152
gca ccg cag ttc cgc ttc aag gaa atc agt cct cgc gtc gag gcc ctc Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu 385 390 395 400	1200

## B7662.ST25.txt

ttc aag cgc cac aac ctc ccg tac tac gac ctg ccc tac acg agc gcg Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala 405 410 415	1248
gtc tcg acc acc ttt gcc aat ctt tat tcc gtc ggc cac tcg gtc ggc Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly 420 425 430	1296
gcc gac acc aag aag cag gac tga Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp 435	1320
<210> 6	
<211> 439	
<212> PRT	
<213> Thraustochytrium ssp.	
<400> 6	
Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala 1 5 10 15	
Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu 20 25 30	
Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe 35 40 45	
Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu 50 55 60	
Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro 65 70 75 80	
Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln 85 90 95	
Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu 100 105 110	
Leu Val Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Tyr 115 120 125	
Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met 130 135 140	
Ser Lys Ala Ser Pro Thr Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly 145 150 155 160	
Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly 165 170 175	
Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Asp Arg Met Cys Glu Phe Phe 180 185 190	

B7662.ST25.txt

Tyr Gly Val Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His  
195 200 205

Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu  
210 215 220

Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val  
225 230 235 240

Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu  
245 250 255

Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr  
260 265 270

Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val  
275 280 285

Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu  
290 295 300

Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly  
305 310 315 320

Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His  
325 330 335

Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala  
340 345 350

Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp  
355 360 365

Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr  
370 375 380

Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu  
385 390 395 400

Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala  
405 410 415

Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly  
420 425 430

Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp  
435

<210> 7  
<211> 1152  
<212> DNA

B7662.ST25.txt

<213> *Calendula officinalis*

B7662.ST25.txt

ttc cga ctc gca atg acc aaa ggg ctc acg tgg gtc cta acc atg tac Phe Arg Leu Ala Met Thr Lys Gly Leu Thr Trp Val Leu Thr Met Tyr 245 250 255	768
ggt ggc ccg tta ctc gtg gtc aac ggt ttc cta gtc ttg atc aca ttc Gly Gly Pro Leu Leu Val Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Phe 260 265 270	816
cta caa cac act cac cct tcg ctc ccg cac tat gac tca acc gaa tgg Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp 275 280 285	864
gat tgg tta cgt ggg gcc ctc acc aca atc gac cgt gat tac ggg atc Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Ile 290 295 300	912
cta aac aaa gtg ttc cat aac ata acc gac act cac gtg gcc cac cat Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His 305 310 315 320	960
ttg ttc tct aca atg cct cat tac cat gca atg gaa gcc acg aag gtg Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Val 325 330 335	1008
ttc aaa ccg att ttg ggc gat tat tat cag ttt gac ggg acc tcg att Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Ser Ile 340 345 350	1056
ttt aag gcg atg tat cgg gaa aca aag gag tgc att tat gtt gat aag Phe Lys Ala Met Tyr Arg Glu Thr Lys Glu Cys Ile Tyr Val Asp Lys 355 360 365	1104
gat gag gag gtg aaa gat ggt gtt tat tgg tat cgt aat aag att taa Asp Glu Glu Val Lys Asp Gly Val Tyr Trp Tyr Arg Asn Lys Ile 370 375 380	1152

<210> 8  
<211> 383

<212> PRT

<213> Calendula officinalis

<400> 8

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Asp Pro Thr Asn Gly Gly Asn Lys  
1 5 10 15

Thr Glu Pro Glu Pro Ile Gln Arg Val Pro His Glu Lys Pro Pro Phe  
20 25 30

Thr Val Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Asn Arg  
35 40 45

Ser Val Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Val Phe Tyr Asp Leu Thr Ile Ala  
50 55 60

Ser Ile Leu Tyr Tyr Ile Ala Asn Asn Tyr Ile Ser Thr Leu Pro Ser  
65 70 75 80

Pro Leu Ala Tyr Val Ala Trp Pro Val Tyr Trp Ala Val Gln Gly Cys  
85 90 95

B7662.ST25.txt

Val Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala  
100 105 110

Phe Ser Asp His Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Val Leu His  
115 120 125

Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg  
130 135 140

His His Ser Asn Thr Gly Ser Ile Glu His Asp Glu Val Phe Val Pro  
145 150 155 160

Lys Leu Lys Ser Gly Val Arg Ser Thr Ala Arg Tyr Leu Asn Asn Pro  
165 170 175

Pro Gly Arg Ile Leu Thr Leu Leu Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro  
180 185 190

[REDACTED] Leu Tyr Leu Thr Phe Asn Val Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Arg Phe Ala  
195 200 205

Cys His Phe Asp Pro Asn Ser Pro Ile Tyr Ser Lys Arg Glu Arg Ala  
210 215 220

Gln Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Val Phe Val Leu  
225 230 235 240

Phe Arg Leu Ala Met Thr Lys Gly Leu Thr Trp Val Leu Thr Met Tyr  
245 250 255

Gly Gly Pro Leu Leu Val Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Phe  
260 265 270

[REDACTED] Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp  
275 280 285

[REDACTED] Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Ile  
290 295 300

[REDACTED] Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His  
305 310 315 320

[REDACTED] Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Val  
325 330 335

[REDACTED] Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Ser Ile  
340 345 350

[REDACTED] Phe Lys Ala Met Tyr Arg Glu Thr Lys Glu Cys Ile Tyr Val Asp Lys  
355 360 365

B7662.ST25.txt

Asp Glu Glu Val Lys Asp Gly Val Tyr Trp Tyr Arg Asn Lys Ile  
370 375 380